



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

20.04.2016 № *БУДО5-258*

На №_____ от _____

Тел: 8 499-193-30-01

Факс: 8 499-193-61-83

<http://www.gamaleya.org>
E-mail: info@gamaleya.org.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора ФГБУ
«ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России
Пронин А.В.

«20» апреля 2016 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Харлампиевой Д.Д. «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Работа Харлампиевой Дарьи Дмитриевны направлена на получение и исследование биологической активности рекомбинантных фрагилизинов. Фрагилизин – металлопротеиназа, секретируемая энтеротоксигенными штаммами *Bacteroides fragilis*. Основным эффектом воздействия ВФТ на кишечный эпителий является нарушение межклеточных контактов, вызванное расщеплением Е-кадгерина. Согласно литературе, данный эффект приводит к увеличению пролиферации клеток, а также к нарушению барьерной функции эпителия кишечника, что способствует развитию воспаления и формированию опухолей. Поэтому изучение механизма действия ВФТ и идентификация его природного субстрата представляется актуальной задачей.

Диссертационная работа Харлампиевой Д.Д. построена по традиционному плану и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы»,

«Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы».

В разделе «**Введение**» описаны актуальность исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы цель и задачи исследования, а также основные положения диссертации, выносимые на защиту, представлены сведения об аprobации работы и достоверности полученных результатов.

В **обзоре литературы** подробно рассмотрены имеющиеся данные, касающиеся характеристики исследуемых белков-фрагилизинов. Раскрыто строение молекулы фрагилизина и процесс созревания пробелка. Рассмотрены эффекты воздействия фрагилизина на эпителиальные клетки и модель патогенеза заболеваний, вызываемых энтеротоксигенными *B. fragilis*. На основании анализа публикаций зарубежных авторов критически обсуждены данные о субстратной специфичности изоформ фрагилизина. В целом обзор литературы дает подробное представление об объекте исследования и обосновывает необходимость проведенной экспериментальной работы.

В разделе «**Материалы и методы**» диссертант описывает использованные в работе современные методы исследования: генно-инженерные методы (выделение плазмидной ДНК, методы рестрикционного анализа, отбор рекомбинантных клонов и другие методы молекулярного клонирования, сайт-направленный мутагенез), получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, методы работы с линиями клеток млекопитающих (культивирование, трансфекция), методы работы с белками (получение и очистка рекомбинантных белков, вестерн-блот гибридизация), методы протеомного анализа и биоинформационные методы. Таким образом, работа выполнена на высоком методическом уровне. Используемые подходы соответствуют решению поставленных задач.

В разделах «**Результаты исследования**» и «**Обсуждение результатов**» автор детально описывает и критически анализирует проведенные эксперименты. В ходе работы Харлампиевой Д.Д. были получены все три известные к настоящему времени изоформы BFT в гетерологичной системе *E. coli* в виде пробелков и разработан способ перевода их в зрелую форму путем ограниченного протеолиза. Далее автором охарактеризована активность полученных рекомбинантных белков с использованием линии клеток НТ-29 и показано, что полученные в представленной работе зрелые рекомбинантные фрагилизины имели такую же активность по отношению к клеткам линии НТ-29, какая описана для фрагилизина из природного источника (*Bacteroides fragilis*), а именно вызывали изменение морфологии (округление) клеток этой линии и приводили к расщеплению Е-кадгерина интактных клеток НТ-29. Таким образом, можно заключить, что полученные в работе рекомбинантные зрелые BFT трех изоформ имеют активность природных аналогов и

подходят для изучения его свойств. Следующий этап работы посвящен проверке предположения, что Е-кадгерин – мембранный белок, участвующий в образовании межклеточных контактов – является субстратом для ВFT. Автором впервые показано, что ВFT не расщепляет рекомбинантный полноразмерный Е-кадгерин напрямую *in vitro*, а расщепление Е-кадгерина происходит только при обработке ВFT интактных клеток. Таким образом, ВFT расщепляет Е-кадгерин не напрямую, как считалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным. Основываясь на полученных результатах, логичным продолжением работы представляется ее следующая часть – попытка идентификации потенциальных природных субстратов для ВFT. Для этого был проведен протеомный анализ культуральной среды после инкубации клеток линии НТ-29 с рекомбинантным ВFT. При этом впервые выявлен ряд белков – потенциальных субстратов для ВFT, которые могут определять его участие в патологических процессах в кишечнике.

Следует отметить также, что в рамках данной работы была определена полная нуклеотидная последовательность генома энтеротоксигенного изолята *B. fragilis*. До настоящего времени в GenBank была доступна информация о полных геномах только неэнтеротоксигенных штаммов *B. fragilis*. В то же время информация о геноме энтеротоксигенных штаммов может быть использована для выяснения механизмов их патогенности. Вышеупомянутые данные, впервые полученные в настоящей диссертационной работе, обуславливают ее **научную новизну**.

Результаты, полученные Харлампиевой Д.Д. в диссертационной работе, имеют **практическое значение**. Эти данные могут быть использованы для выяснения механизма действия ВFT на клетки эпителия кишечника. Понимание молекулярных механизмов заболеваний, с которыми ассоциированы энтеротоксигенные штаммы *B. fragilis*, может способствовать разработке новых способов их лечения и профилактики.

К представленной работе есть ряд замечаний:

1. На рисунке 24, иллюстрирующем результаты Вестерн-блот гибридизации белков из культуральной жидкости *B. fragilis* с антителами к ВFT, необходимо представить маркер молекулярных масс.

2. В работе изучали три изоформы фрагилизина *B. fragilis*. Однако на части рисунков, иллюстрирующих полученные результаты, представлены данные только для одной из изоформ, и в подписи к рисунку или в тексте диссертации указано, что для остальных изоформ результаты были такими же (например, рисунок 25), а на других рисунках приведены данные для всех трех изоформ, хотя различий между ними не наблюдалось (например, рисунок 29). Следовало выбрать единый формат иллюстрирования результатов исследования.

3. В работе были идентифицированы фрагменты мембранных белков клеток линии НТ-29, количество которых увеличивается в культуральной среде после обработки клеток посредством BFT. Проводили ли исследования изменения внутриклеточных белков после обработки клеток BFT?

Указанные замечания не меняют положительного впечатления от работы и ни в коей мере не снижают значимость и ценность полученных результатов. Для решения поставленных задач в работе использовались современные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Таким образом, научные положения и выводы, изложенные в диссертации, **достоверны, обоснованы** и подтверждены фактическим материалом.

Результаты диссертации представлены в статьях, опубликованных в международных журналах, индексируемых Web of Science, а также обсуждены на конференциях, как российских, так и зарубежных. Текст авторефера достаточно полно отражает содержание диссертации. Оформление диссертации соответствует требованиям ВАК РФ.

Результаты проведенных исследований можно рекомендовать к ознакомлению и использованию в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Диссертационная работа Харлампиевой Д.Д. является законченным научно-квалификационным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью и соответствует критериям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013), а ее автор, Харлампиева Д.Д., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Отзыв заслушан и утвержден на межлабораторном семинаре лаборатории клеточной микробиологии и лаборатории молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации 14 апреля 2016 г., протокол № 1/16 от «14» апреля 2016 г.

Зав. лабораторией
клеточной микробиологии,
доктор биологических наук

Логунов Д.Ю.

